

Schweizerisches Tropeninstitut und
Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Basel

Über die Züchtbarkeit von *Trypanosoma*
brucei und dessen Vermehrungsfähigkeit
in virusinfizierten Wirten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Kurt Bienz

aus Basel/BS

1967

Basel 1968

Verlag für Recht und Gesellschaft AG., Basel

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. H. Löffler und Dr. R. Geigy.

Basel, den 7. Februar 1967.

Prof. Dr. H. Huber
Dekan



INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	39
2. Material und Methoden	41
3. Versuche	42
3. 1. Isolierung, Identifizierung und Beschreibung des verwendeten Ornithosevirus-Stammes	42
3. 2. Zur Züchtbarkeit von <i>Trypanosoma brucei</i>	44
3. 3. Einfluß von Ornithosevirus auf 25° C-Kulturformen von <i>Trypano-</i> <i>soma brucei</i>	50
3. 4. Einfluß von Ornithosevirus auf 37° C-Kulturformen von <i>Trypano-</i> <i>soma brucei</i>	54
3. 5. Einfluß von Ornithose- und Influenzavirus auf Blutformen von <i>Trypanosoma brucei</i> im Blutkreislauf des Hühnerembryos	56
3. 6. Einfluß von Ornithose- und Influenzavirus auf Blutformen von <i>Trypanosoma brucei</i> im immunologisch vollwertigen Wirt	58
4. Diskussion	64
5. Literaturverzeichnis	67
Résumé	70
Summary	71

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, anhand des Modells von trypanosomeninfizierten Wirtssystemen, die mit Viren (vor allem Ornithosevirus) superinfiziert werden, Einblick in die zum Teil eigenartigen Verhältnisse bei Mehrfachinfektionen zu erhalten. Aus den Veröffentlichungen über Doppelinfektionen ergeben sich völlig verschiedene Möglichkeiten: entweder wird der eine der beiden Erreger durch den andern gehemmt, oder es tritt eine gegenseitige Verstärkung der beiden Infektionen auf.

Als Beispiel für eine Hemmung des einen Parasiten durch den andern seien die Arbeiten von JACOBS (1957), TRAGER (1959) und YOELI, BECKER & BERNKOPF (1955) und CORBET et al. (1961) erwähnt, die feststellten, daß bestimmte Viren, wie Ornithose-, West-Nile- und O'nyong-nyong-Viren, die Plasmodieninfektion in Enten, Mäusen oder Anophelen hemmen. PETERS (1965) beobach-

tete, daß Eperythrozoon den Verlauf von *Plasmodium berghei*-Infektionen in Mäusen verzögert. BARNETT (1963) beschrieb ähnliche Phänomene für die Entwicklung von Babesien in Tieren, die mit Eperythrozoon infiziert waren, und FOOTE et al. (1957) stellten einen hemmenden Effekt von Eperythrozoon auf *Anaplasma fest*. In einem ganz andern System, nämlich in Mäusen, die mit Borrelien infiziert sind, kann sich, gemäß den Arbeiten von LAPIÈRE, GAILLARD & ROUSSET (1964) *Trypanosoma brucei* nicht mehr entwickeln. Der Vollständigkeit halber seien die zahlreichen Arbeiten auf dem Gebiet der Virus-Virus-Doppelinfektionen erwähnt, wo das verantwortliche Agens der gegenseitigen Beeinflussung als Interferon bezeichnet wird (vgl. die Arbeiten von ISAACS, LINDENMANN, HENLE u. a.).

Das Umgekehrte, nämlich eine Verstärkung der einen oder beider Infektionen, beschrieben HSU & GEIMANN (1952) in Ratten, wo Haemobartonellen eine Zunahme der Plasmodien-Infektion bewirken. Ebenso fanden GLEDHILL (1956) und GLEDHILL & NIVEN (1957) eine verstärkte Pathogenität von Mäuse-Hepatitis-Virus resp. von bakteriellen Toxinen durch Eperythrozoon. GEIGY & AESCHLI-MANN (1957) berichteten über Versuche, bei welchen in Ratten eine natürliche Infektion mit *Trypanosoma lewisi* die Parasitaemie durch *Borrelia duttoni* beschleunigte. GEIGY (pers. Mitteilung) stellte im Anschluß daran auch fest, daß bei diesen Doppelinfektionen beide Erreger länger in ihrem Wirtstier, der Ratte, persistieren als bei Einzelinfektionen.

Ein weiterer Aspekt dieses Problems ist folgender: Es ist jedem Tropenmediziner bekannt, daß Bakterien-, Virus- oder Protozoeninfekte in den Tropen unter Umständen ganz anders verlaufen können als in der gemäßigten Zone. Ein Grund dafür dürfte unter anderen das in den Tropen weitaus häufigere Vorkommen von Mehrfach-Infektionen sein. Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wird versucht, auf einige Faktoren hinzuweisen, die für die gegenseitige Beeinflussung zweier völlig verschiedener Mikroorganismen im Säugetierwirt mitbestimmend sind.

In dieser Arbeit wurde zuerst das Verhalten der einzelnen Erreger in den verschiedenen Wirtssystemen, wie Zellkultur, Hühnerembryo und Labormaus untersucht. Hernach wurde der Einfluß von Viren, vor allem eines Ornithosevirusstammes, auf *Trypanosoma brucei* näher geprüft.

Es ergeben sich dabei folgende 4 Abschnitte:

- Einfluß von Ornithosevirus auf 25 °C-Kulturformen von *Trypanosoma brucei*, d. h. auf Trypanosomen, die in FL-Zellkulturen gezüchtet werden.
- Einfluß von Ornithosevirus auf 37° C-Kulturformen von *T. brucei*, d. h. auf Trypanosomen, die sich in der Allantoishöhle des befruchteten Hühneris vermehren.
- Einfluß von Ornithose- und Influenzavirus auf Blutformen (37° C) von *T. brucei* im Blutkreislauf des Hühnerembryos.
- Einfluß von Ornithose- und Influenzavirus auf Blutformen (37° C) von *T. brucei* im immunologisch vollwertigen Wirt, d. h. auf Trypanosomen, gehalten in der Labormaus.

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung meiner verehrten Lehrer, den Herren Professoren R. Geigy und H. Löffler. Für ihr Interesse und ihre wertvollen Anregungen möchte ich ihnen herzlich danken. Ebenso danke ich Fräulein Th. C. Imobersteg (Institut für Mikrobiologie und Hygiene) für ihre Einführung in die Methoden der Viruszüchtung und Fräulein M. Kauffmann (Schweizerisches Tropeninstitut) für ihre Anleitung und Ratschläge zur Trypanosomenzüchtung.

2. Material und Methoden

2. 1. Trypanosomen

Es wurde für alle Experimente der Stamm *Trypanosoma brucei* Lab. 110 verwendet, der im September 1958 in Ostafrika aus einem natürlich infizierten Hausrind durch Rattenpassage isoliert, tiefgefroren und dem Schweizerischen Tropeninstitut, Basel, zugesandt wurde. Der Stamm wurde mit 15% Glycerin zum Teil in Trockeneis bei -76°C und zum Teil in flüssigem Stickstoff bei -198°C aufbewahrt. Daneben wurde er auch ständig durch Blutpassagen auf Meerschweinchen und weißen Mäusen gezüchtet. Um 25°C -Kulturformen zu gewinnen, wurden die Parasiten von Mäusen auf Blutagar nach Weinmann verbracht und in diesem Medium über mehrere Passagen gehalten. Von diesem Nährboden aus wurden für die Doppelinfektionsversuche mit 25°C -Kulturformen FL-Zellkulturen beimpft.

Über die bei der Züchtung von *T. brucei* aufgetretenen Probleme, vor allem auch bei der Verwendung des befruchteten Hühnereis als Wirt, soll im Abschnitt 3. 2. näher berichtet werden.

2. 2. Viren

Neben einigen orientierenden Versuchen mit Myxoviren (vor allem Influenzavirus A-PR₈ und A₂-Switzerland 1-57) wurde hauptsächlich mit einem Ornithosevirusstamm gearbeitet, den ich anlässlich einer Epidemie in einer Wellensittichzucht selbst isolieren konnte. Eine genauere Beschreibung des Stammes, seiner Züchtbarkeit und seines Vermehrungszyklus wird in Abschnitt 3. 1. gegeben.

Ornithose-Antikörperbestimmungen: Da die Mäuse in meinen Versuchen mit virushaltigem Dottersackmaterial oder mit Allantoisflüssigkeit gespritzt wurden, konnte der Antikörpertiter nicht mit der Komplementbindungsreaktion (in der als Antigen Dottersacksuspension verwendet wird) bestimmt werden, da sonst eine falsch-positive Reaktion erwartet werden mußte. Ich verwendete deshalb die Haemagglutinationshemmung (HILLEMANN, HAIG & HELMOLD, 1951) gegen 4 haemagglutinierende Einheiten. Diese Methode liefert nach eigenen Versuchen mit menschlichen Patientenserum etwa 4fach niedrigere Antikörpertiter als die KBR.

Titration der Ornithosevirus-Präparate: Ornithosevirushaltige Dottersacksuspensionen, resp. Allantoisflüssigkeit wurde von mehreren Eiern zusammengekommen und bei -30°C aufbewahrt, was ohne Aktivitätseinbuße während ca. 3 Wochen möglich ist; so konnten die Versuche immer mit bekannten Virusdosen ausgeführt werden. Die Titration führte ich in Eiern (Dottersack) und Mäusen aus, wobei ich einestils die DL_{50} bestimmte (REED & MUENCH, 1938) andererseits die "Single Dilution Method" nach GOLUP (1948) anwandte, weil damit zugleich festgestellt werden kann, nach welcher Zeit und bei welcher Virusdosis das Versuchstier, resp. der Embryo stirbt.

2. 3. Zellen

Von den mir zur Verfügung stehenden etablierten Zellstämmen HeLa, KB und FL eignet sich der Nicht-Karzinomstamm FL (menschliche Amnionzellen) am besten für die Propagierung von Ornithosevirus; die Trypanosomen zeigen aber keine Unterschiede im Wachstum auf den verschiedenen Zelltypen (vgl. hierzu die Arbeit von DEMARCHI & NICOLI, 1960). Es wurde daher für die Doppelinfektionsversuche ausschließlich der FL-Stamm verwendet. Die Zellen wurden

zuerst in Melnick'schem Medium unter Zusatz von 10% Kälberserum gezüchtet und für die Doppelinfektionsversuche in Tissue-Culture-Medium 199 (TC 199, Difco) mit 10% Kälberserum verbracht, da nach eigenen Erfahrungen das Melnick'sche Medium die Vermehrung von Trypanosomen nicht fördert.

2. 4. Hühnerembryonen

Es wurden 7—11 Tage alte bei 37° C vorbebrütete Hühnereier aus einer Basler Geflügelzucht verwendet. Für die Inokulationstechnik hielt ich mich an die Angaben von BEVERIDGE & BURNET (1946).

Neu entwickelte ich lediglich die Technik zur Gewinnung von allantoisflüssigkeitsfreiem Blut resp. blutfreier Allantoisflüssigkeit: Die Schale des Eies wird über dem Luftsack weggeschnitten und das Ei vor eine starke Glühbirne gehalten. So sieht man unter der Eimembran die Gefäße der Chorion-Allantoismembran (CAM) durchscheinen. Mit einer doppelt ausgezogenen, haarfeinen Kapillare kann man jetzt mit einiger Übung wahlweise Blut gewinnen durch Punktieren eines größeren oder kleineren Gefäßes, je nach der gewünschten Blutmenge, oder aber Allantoisflüssigkeit ohne Blutbeimischung erhalten, indem man zwischen den Gefäßen durchsticht und sorgfältig aspiriert. Unter Anwendung strikter aseptischer Technik können die Embryonen unbeschadet mehrere Entnahmen bis zu 0,1 ml Blut pro Tag wie auch bis zu 0,5 ml Allantoisflüssigkeit pro Tag überstehen.

2. 5. Mäuse

Infektionsversuche mit Ornithosevirus und Trypanosomen auf den mir zur Verfügung stehenden Inzuchtmäusestämmen C3H/Gif und C3H-eB/Gif einerseits und den nicht in Inzucht gehaltenen weißen Labormäusen andererseits zeigten, daß die Inzuchtstämme deutlich regelmäßigere Resultate liefern. Deswegen wurden alle Titrationen von Ornithosevirus und die Doppelinfektionsversuche auf den beiden C3H-Stämmen durchgeführt. Zur Haltung und Vermehrung der Trypanosomen hingegen benützte ich die gewöhnlichen weißen Mäuse.

2. 6. Statistik

Mit Hilfe einer einfachen statistischen Methode, dem sogenannten «Rang-Test» nach Wilcoxon (vgl. PFANZAGL, 1966), wurden die erhaltenen Resultate aus den einzelnen Versuchsgruppen geprüft. Die Werte wurden als signifikant verschieden bezeichnet, wenn die Null-Hypothese (d. h. kein Unterschied zwischen Versuch und Kontrolle) mit 95% Wahrscheinlichkeit verworfen werden konnte.

Die Anordnung und Ausführung der Doppelinfektionsversuche wird jeweils bei den einzelnen Versuchsgruppen (Abschnitt 3. 3. bis 3. 6.) näher beschrieben.

3. Versuche

3. 1. Isolierung, Identifizierung und Beschreibung des verwendeten Ornithosevirus-Stammes

3. 1. 1. *Quelle:* Im Sommer 1964 trat in einer Wellensittichzucht eine Ornithose-Epidemie auf, die höchstwahrscheinlich auf im

gleichen Raum gehaltene, frisch eingefangene Tauben zurückzuführen ist. Die Wellensittiche erkrankten 10–14 Tage nach dem nur kurze Zeit dauernden Kontakt und starben nach weiteren 7–10 Tagen. Bei der Sektion zeigten sie vor allem frische, pneumonische Herde in der Lunge und eine gelblich verfärbte Leber, daneben ein Exsudat im Abdomen. Mikroskopisch wiesen vor allem Lebertupfpräparate die typischen Ornithose-Elementarkörperchen auf. Von den Tauben stand leider kein Material zur Verfügung für eine Untersuchung.

3. 1. 2. *Isolierung*: Steril entnommene Leber wurde in physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert und intraperitoneal auf weiße Mäuse und in den Dottersack von 7tägigen Bruteiern inokuliert. Der Erreger konnte mikroskopisch wiederum in Giemsa- und Gram-gefärbten Präparaten von Mäuseleber und -milz und von Dottersackepithel der Hühnerembryonen gefunden werden. Ebenso fiel der Nachweis von komplementbindenden Ornithoseantikörpern im Mäuse- und Wellensittichblut positiv aus.

3. 1. 3. *Pathogenität; Toxinbildung*: Erst nach 4 Blindpassagen im Dottersack von 7- bis 10tägigen Hühnerembryonen war der Stamm soweit adaptiert und angereichert, daß er Mäuse innerhalb einer Woche nach i.p. Injektion und Hühnereier in 3 Tagen nach Dottersackinjektion tötete; in der nachfolgenden Passage zeigte der Stamm nach Verimpfen in die Allantoishöhle von 9tägigen Hühnerembryonen das typische Ornithosehaemagglutinin für Mäuseerythrozyten (HILLEMANN, HAIG & HELMOLD, 1951). Zugleich konnte durch intravenöses, aber auch durch intraperitoneales Verimpfen von infektiösem, frischem Dottersackmaterial auf Mäuse das Ornithosetoxin nachgewiesen werden, welches Mäuse innerhalb von ca. 20 Std. tötet (RAKE & JONES, 1944; MANIRE & MEYER, 1950).

3. 1. 4. *Vermehrungszyklus*: Ornithoseviren zeigen einen komplizierten, intrazellulär verlaufenden Vermehrungszyklus, der zuerst von BEDSON & BLAND (1932) beschrieben wurde. Trotz sehr vieler Arbeiten auf diesem Gebiet (vgl. BEDSON, 1933; BEDSON & BLAND, 1934; BEDSON & GOSTLING, 1954; BLAND & CANTI, 1935; BUCKLEY, WHITNEY & RAPP, 1955; BURNET & ROUNTREE, 1935; CROCKER et al., 1965; GIRARDI, ALLEN & SIGEL, 1952; LITWIN, 1957, 1959, 1961; SWAIN, 1955; TAJIMA, NOMURA & KUBOTA, 1957; YANAMURA & MEYER, 1941), in denen z. T. auch mit modernen Techniken, wie Elektronenmikroskopie, Autoradiographie und Immunofluoreszenz, gearbeitet wurde, sind immer noch manche Fragen offen.

Mit meinem eigenen Stamm versuchte ich, soweit möglich, den Zyklus zu bestätigen, wie er aus den diversen Literaturangaben rekonstruiert werden kann. Ich hielt mich dazu in technischer Beziehung an die Angaben von BURNET & ROUNTREE (1935), d. h. ich verfolgte die Vermehrung von Ornithosevirus in Abklatschpräparaten von Chorion-Allantoismembranen aus infizierten Hühnerembryonen, welche verschiedene Zeiten p.i. getötet wurden. Neben der gewöhnlichen Giemsa-Färbung (pH 7,0) stellte ich auch Präparate her, die anschließend an eine Giemsa-Färbung mit Alkohol und Orange-G-Tannin differenziert wurden.

Der Vermehrungszyklus meines Ornithosevirusstammes in der CAM des Hühnerembryos verläuft, in Übereinstimmung mit den meisten Literaturangaben, nach folgendem Schema:

Schon bald (2 Std.) nach der Inokulation dringen die tiefviolett gefärbten Elementarkörperchen in die Zellen ein. Sie wandeln sich dann (bis 9 Std. p.i.) in die hellroten, großen, jungen Stadien um. Homogene Plaques konnten nie beobachtet werden, was meinen Stamm entsprechend der Meinung von GORDON & QUAN (1962) (cit. nach MOULDER, 1964) in die Untergruppe B der Psittacose-Familie stellen würde, andererseits aber auch auf färbetechnische Unterschiede zwischen meinen Versuchen und den in der Literatur beschriebenen zurückzuführen sein könnte (vgl. BLAND & CANTI, 1935). Nun tritt die Phase der Vermehrung ein, die nach 22 Std. abgeschlossen ist und der Umwandlung in violette, mehr oder weniger intensiv gefärbte Elementarkörperchen Platz macht. Nach ca. 30 Std. ist der Zyklus vollständig abgeschlossen; man findet geplatzte Zellen mit großen Mengen von Elementarpartikeln und auch schon durch die zweite Virusgeneration infizierte Zellen.

3. 2. Zur Züchtbarkeit von *Trypanosoma brucei*

3. 2. 1. *Auf Mäusen:* Der Stamm *Trypanosoma brucei* Lab. 110 läßt sich auf den erwähnten Inzuchtstämmen C3H/Gif und C3H-eB/Gif sehr gut züchten und tötet die Mäuse sehr regelmäßig in 3–30 Tagen, je nach der verimpften Trypanosomenkonzentration und dem Inokulationsort: intraperitoneal verläuft die Infektion am raschesten, subcutan am langsamsten. Nach i.p. Injektion von trypanosomenhaltigem Blut vermehren sich die Erreger nicht nur im Blut, sondern auch im Ascites. Sie liegen dabei, im Gegensatz zu den im Blut zirkulierenden polymorphen Formen, fast vollständig in der Kurzform mit starker Volutineinlagerung vor. Diese Umwandlung ist nach ca. 24 Std. abgeschlossen. Es ist dabei unbekannt, ob aus diesen Ascitesformen ein ständiger Nachschub ins Blut erfolgt oder ob die Vermehrung in beiden Systemen unab-

hängig ist. Jedenfalls findet ein solcher Übertritt aus dem Ascites ins Blut gleich nach der Inokulation statt, da ja verimpfte Trypanosomen sehr rasch nach der Injektion in die Blutbahn gelangen; aber ob die ausgebildeten Ascitesformen die Fähigkeit, den Blutstrom zu befallen, noch besitzen, ist nicht geklärt.

3. 2. 2. *In Kultur* (25° C): Die Kultur bei 25° C von Trypanosomen der Brucei-Gruppe gelingt relativ leicht auf Blutagar-Nährböden, vor allem in der Modifikation nach Weinmann (pers. Mitteilung). Es entstehen dabei sog. Kulturformen von Trypanosomen, welche morphologisch mit den Tsetse-Formen identisch sind. Für meine Versuche ist aber ein Agar-Nährboden unbrauchbar, da sich damit keine übersichtlichen Bedingungen ergeben, vor allem deswegen, weil man nie genau weiß, welche Substanzen und wieviel aus dem Agar heraus oder in den Agar hinein diffundieren.

Die Zucht in flüssigen Medien ist aber recht schwierig. Es gelang mir nicht, die Resultate von DODIN & FROMENTIN (1962) und von NICOLI (1961) zu reproduzieren. Deswegen begann ich eigene Medien auszuprobieren, die als Grundsubstanz Bouillon, TC 199 (Difco), Melnick, Caseinhydrolysat (Institut Pasteur), Ringerlösung, Earle, Lockelösung oder Eagle (Difco) enthielten. Diese Substanzen wurden mit tierischem oder menschlichem Blut oder Blutbestandteilen angereichert.

Nur einer von insgesamt 40 ausprobierten Nährböden eignete sich zur Zucht von *T. brucei*, und zwar Eagle'sches Medium (Difco), das zuerst während 5 Tagen auf einem Menschenblutagar nach Weinmann bei 25° C inkubiert wird. Diese Flüssigkeit wird unmittelbar vor dem Beimpfen mit Trypanosomen vom Blutagar abgegossen und mit 20% lysiertem Menschenblut versetzt. Die Trypanosomen konnten während 5 Monaten in 22 Passagen in diesem Nährboden gehalten werden.

Auf ein Arbeiten mit diesem Medium wurde aber für die Doppelinfektionsversuche verzichtet, weil sich schon nach kurzer Zeit in den Kulturen Proteinniederschläge bilden, welche die Beobachtung der Trypanosomen stören und ihre Färbbarkeit beeinträchtigen. Auch ist die Herstellung der Kulturlösung recht kompliziert. Aus diesen Gründen ging ich dazu über, die Trypanosomen in FL-Zellkulturen zu züchten, wobei sich TC 199 (Difco), angereichert mit 10% Kälberserum, am besten bewährt.

3. 2. 3. *In Zellkulturen* (25° C): Ca. 200 000 FL-Zellen wurden mit 1 ml Melnick'scher Lösung in Reagenzröhrchen gegeben und bei 37° C inkubiert. 24–48 Std. später wurde dieses Medium entfernt und in TC 199 + 10% Kälberserum suspendierte Trypanosomen

eingbracht. Die Vermehrung der Protozoen erfolgt dann bei 25° C, wie in Abb. 1 dargestellt, welche auch einen Vergleich zeigt mit Kulturen im gleichen Medium ohne FL-Zellen. Die Trypanosomen liegen auch hier in denselben Formen vor wie in Blutagar-kulturen und in der Tsetse-Fliege.

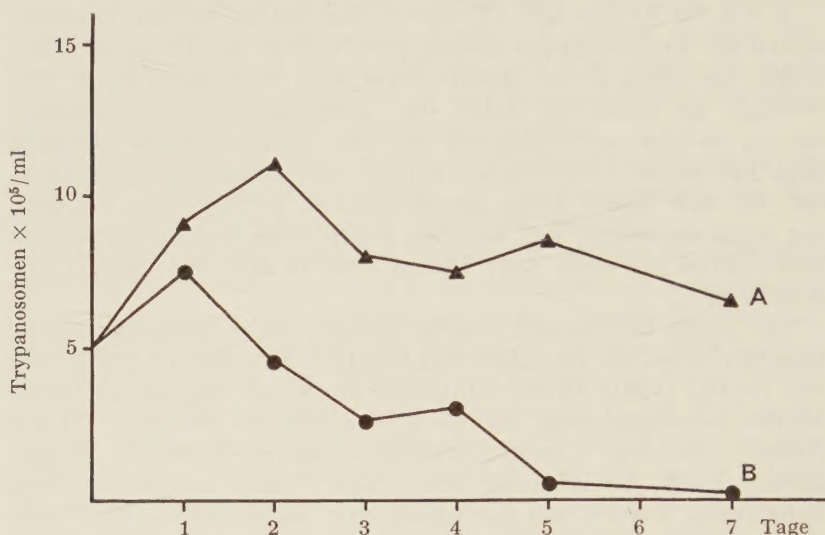


Abb. 1. Vermehrung von *T. brucei* in TC 199 mit 10% Kälberserum.
A: mit FL-Zellen. B: ohne Zellen.

3. 2. 4. *Im befruchteten, sich entwickelnden Hühnerembryo (37° C):* Das in der Virologie häufig zur Kultivierung von verschiedenen Viren verwendete befruchtete Hühnerei wird erstmals 1939 von LONGLEY et al. mit gutem Erfolg zur Züchtung von verschiedenen Trypanosomen verwendet. Unabhängig davon wird von HALLAUER & KUHN (1940) über ähnliche Versuche berichtet. Dieses Verfahren nehmen 1962 FAGARD et al. wieder auf. Alle diese Autoren beimpfen das Ei mit trypanosomenhaltigem Mäuseblut mittels eines künstlichen Luftsackes auf die Chorion-Allantoismembran (= CAM) und passieren nach 5 Tagen das Blut des Embryos, in dem sich die Parasiten vermehrt haben, auf die gleiche Weise weiter. Sie verwenden 8–10 Tage alte Embryonen. HALLAUER & KUHN (1940) bemerken außerdem, daß sich in höheren Passagen die Parasiten auch durch die technisch wesentlich einfachere Verimpfung des trypanosomenhaltigen Embryoblutes in die Allantoishöhle weiterzüchten lassen. Er untersuchte auch die auftretenden Formen morphologisch und stellte fest, daß sie sich durch nichts von den üblichen polymorphen Blutformen unterscheiden. Die Pathogenität für Mäuse bleibt ebenfalls erhalten.

Mit eigenen Versuchen, die ich nach der Technik der erwähnten Autoren ausführte, konnte ich deren Resultate zunächst bestätigen: auf die CAM geimpfte Trypanosomen vermehren sich im Blut des Embryos und können beliebig lang passiert werden. Aber auch direkt in die Allantoishöhle von Hühnerembryonen injiziertes trypanosomenhaltiges Mäuseblut ergibt mit meinem Trypanosomenstamm eine gute Parasitaemie des Embryos. Die technisch komplizierte Impfung auf die CAM ist also nicht unbedingt nötig, führt aber rascher zur Parasitaemie als die Allantoisimpfung.

Eine eingehende Untersuchung der am 10. Tag in die Allantois geimpften Eier ergab eine Reihe von neuen Befunden:

Die Trypanosomen vermehren sich in der Allantoisflüssigkeit bis zum 16. Embryonaltag. Dann verschwinden sie plötzlich, und man findet in der Flüssigkeit höchstens noch einige Leichen. Gleichzeitig oder etwas früher, meist am 15. Embryonaltag, treten die Trypanosomen im Blut auf. In größeren Blutmengen (ca. 1 ml), durch Punktion von größeren Blutgefäßen erhalten, lassen sich schon vor dem 15. Embryonaltag durch Verimpfen auf Mäuse Trypanosomen nachweisen.

In einer Versuchsserie mit verschiedenen alten Eiern, die am 9. bis 13. Embryonaltag geimpft wurden, zeigte sich stets das gleiche Bild: nach dem 16. Embryonaltag enthält die Allantois keine lebenden Trypanosomen mehr. Es handelt sich also um eine Veränderung der Allantoisflüssigkeit mit zunehmendem Alter der Embryonen, nicht etwa um ein Erschöpfen der Kultur, wie weiter unten noch zu besprechen sein wird.

Die morphologische Untersuchung der Trypanosomen aus dem Blut und der Allantois ergab folgende überraschende Feststellung: Während im Blut nur die typischen polymorphen Blutformen der Brucei-Gruppe nachgewiesen werden konnten, verschwanden in der Allantois innerhalb 24–48 Std. die Blutformen vollständig, und an ihre Stelle traten meist stark volutinhaltige Kulturformen. Es wurden in wechselnden Mengen Mitteldarm- und Crithidiaformen sowie breite, in multipler Teilung sich befindliche Protozoen festgestellt, also Formen, wie sie in jeder Weinmann-Kultur und auch in Zellkultur (bei 25° C!) gefunden werden können.

Eine Untersuchung der Pathogenität der beiden Formen für die Maus ergab folgendes: Die Blutformen zeigen ohne weiteres eine, wenn auch durch den Wirtswechsel etwas verzögerte, Pathogenität für weiße Mäuse. Die Kulturformen hingegen, die nach 3–6 Tagen Aufenthalt im Ei auf Mäuse geimpft wurden, waren nicht mehr fähig, sich in der Maus zu vermehren: auch nach zweieinhalb Monaten wiesen die mit Kulturformen infizierten Mäuse keine Parasitaemie auf. Ebenso vermögen sich die Kultur-

formen aus der Allantois, wenn sie wiederum in die Allantoishöhle eines 8–10tägigen Hühnerembryos gespritzt werden, in der auf diese Weise angesetzten 2. Passage kaum mehr zu vermehren. Sie gehen sogar sofort zugrunde, wenn dem Inoculum nicht mindestens 2% normales Mäuse-, Menschen- oder Hühnerembryoblut zugesetzt wird. Eine 3. Passage von reinen Kulturformen ist nach meinen Erfahrungen überhaupt nicht möglich.

Die nächsten Untersuchungen zeigen den Grund für das Absterben der Trypanosomen in der Allantoisflüssigkeit am 16. Embryonaltag. Zunächst wurde der pH der Allantoisflüssigkeit bei einer größeren Menge beimpfter und unbeimpfter Eier gemessen. Der Verlauf des pH während der Embryonalentwicklung vom 10. bis 18. Embryonaltag ist bei beiden Gruppen sehr ähnlich, so daß ein Einfluß der Trypanosomen auf diese Größe praktisch vernachlässigt werden kann (Abb. 2). Der pH verläuft, mit einer gewissen Streuung natürlich, leicht sinkend zwischen 8 und 7 vom 10. bis 15. Embryonaltag. Dann fällt er innert 24 Std. rasch ab auf Werte unter pH 6,5 und bleibt dann wieder relativ konstant.

Die Abb. 3, die eine Korrelation zwischen Trypanosomenwachstum in der Allantoishöhle und dem pH der Flüssigkeit darstellt, zeigt, daß die Parasiten bei einem pH unter ca. 6,5 nicht mehr existieren können, also in Verhältnissen, welche nach dem 16. Embryonaltag in der Allantoishöhle herrschen. Damit dürfte das Zugrundegehen der Kulturformen nach einer Bebrütungszeit der Eier von etwa 16 Tagen erklärt sein.

Abb. 3 zeigt bei 5 von total 64 Eiern ein abweichendes Verhalten: sie haben zwar einen pH in der Allantois von über 6,5, aber trotzdem keine lebenden Kulturformen mehr. Erstaunlicherweise wiesen aber alle diese Eier eine relativ hohe Parasitaemie auf. Das brachte mich auf den Gedanken, daß vielleicht in Eiern mit hoher Parasitaemie die Allantoisflüssigkeit, trotz physiologischem pH,

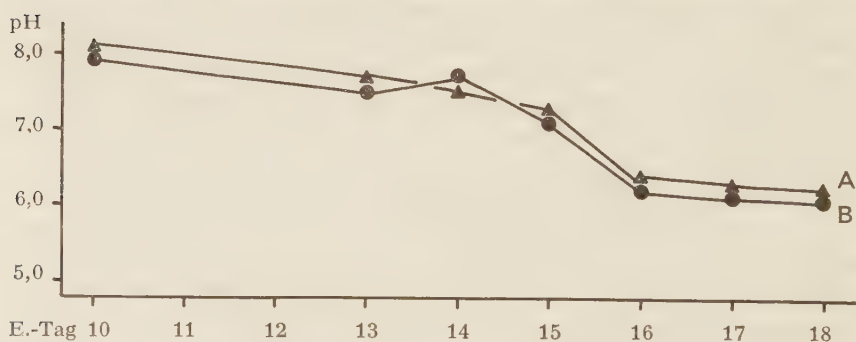


Abb. 2. pH der Allantoisflüssigkeit von Hühnerembryonen.
A: nicht infizierte Embryonen. B: mit *T. brucei* infizierte Embryonen.

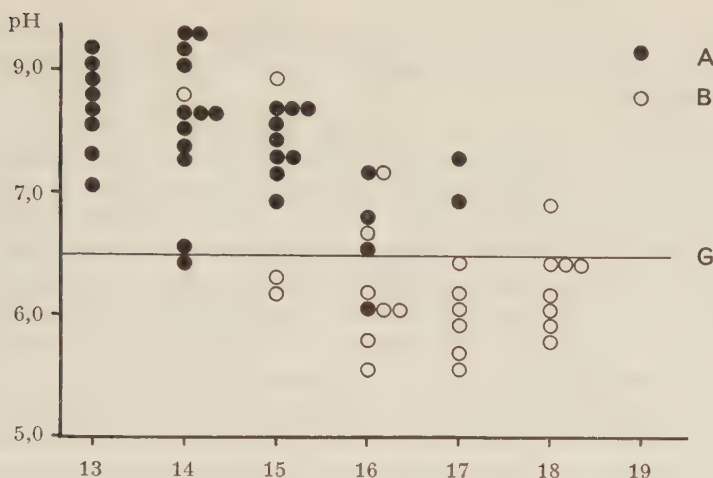


Abb. 3. Korrelation zwischen pH und Trypanosomen-Vermehrung in der Allantoishöhle von Hühnerembryonen. A: positiv, lebende Trypanosomen in der Allantoishöhle. B: negativ; keine oder tote Trypanosomen in der Allantoishöhle. G: Grenz-pH von 6,5.

toxische Stoffe (Abbauprodukte?) enthalten könnte. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde folgender Versuch durchgeführt: Um rasch eine möglichst hohe Parasitaemie zu bekommen, wurden eine Serie Eier zuerst auf die CAM mit Blutformen beimpft, was schon in ca. 24 Std. zu einer meßbaren Parasitaemie führt, im Gegensatz zur Allantoisimpfung (siehe oben). Einen Tag später wurden in die Allantois der selben Eier nochmals Blutformen von Trypanosomen gespritzt. Eine 2. Gruppe von Eiern erhielt nur in die Allantois Trypanosomen. Nun wurde täglich bei beiden Gruppen die Parasitaemie und der Gehalt an Trypanosomen in der Allantois geprüft: dabei ließ sich aber keine Korrelation zwischen den beiden Größen Parasitaemie—Trypanosomen in der Allantoishöhle finden, was diese Vermutung eines toxischen Abbauproduktes als Folge der Parasitaemie nicht stützt.

Es seien hier kurz die Resultate dieser eigenen Versuche, die das zum Verständnis der folgenden Doppelinfections-Versuche Wesentliche enthalten, zusammengefaßt:

- a) Wenn Blutformen von *T. brucei* aus der Maus oder aus dem Blut von Hühnerembryonen auf die CAM des 10tägigen Hühnerembryos gebracht werden, so entwickelt sich eine Parasitaemie, welche den Embryo 5–10 Tage p.i. tötet. Die Trypanosomen sind dabei nur im Blut nachzuweisen und liegen in der typischen polymorphen Blutform vor.

b) Wenn Blutformen von *T. brucei* statt auf die CAM in die Allantoishöhle des Eies geimpft wurden, so ereignen sich zwei Dinge:

- ein Teil der Trypanosomen dringt ebenfalls in den Blutkreislauf des Embryos ein und bleibt infolgedessen in der Blutform.
- der weitaus größere Teil des Inoculums bleibt in der Allantoishöhle, vermehrt sich dort, aber wandelt sich dabei um in typische Kulturformen, die morphologisch nicht von denjenigen auf Weinmann-Agar oder in Zellkultur unterscheidbar sind. Diese Formen sind für Mäuse nicht infektiös. Die Ähnlichkeit dieser Formen mit den bei 25° C gehaltenen Zellkulturformen kann nur eine morphologische, nicht aber eine physiologische sein, da sie sich ja bei 37° C vermehren können und die Zellkulturformen eine Erhöhung der Temperatur nicht ertragen. Diese Allantoisformen der Trypanosomen werden im folgenden als 37° C-Kulturformen bezeichnet.

Eine schematische graphische Darstellung veranschaulicht die beschriebenen Verhältnisse (Abb. 4).

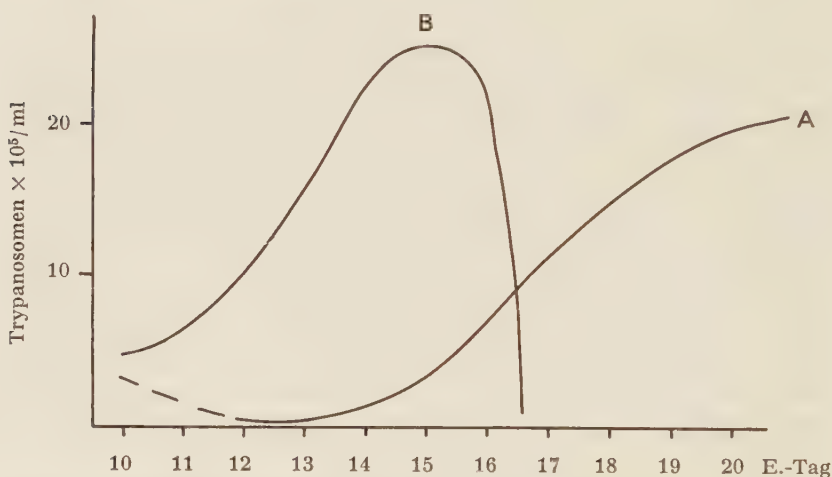


Abb. 4. Schematische Darstellung der Trypanosomen-Vermehrung und -umwandlung in Hühnerembryonen. A: Blutform. B: Kulturform.

3. 3. Einfluß von Ornithosevirus auf 25° C-Kulturformen von *Trypanosoma brucei*

Um den Einfluß von Ornithosevirus auf 25° C-Kulturformen von *T. brucei* zu studieren, wählte ich als Wirtssystem, wie im Abschnitt 3. 2. 2. und 3. 2. 3. dargelegt, die FL-Zellkultur in TC 199 mit 10% Kälberserum. Diese Art der Kultur in flüssigem

Medium ergibt übersichtlichere Bedingungen als der sonst zur Züchtung von Trypanosomen verwendete Blutagar.

3. 3. 1. *Versuchsordnung*: Pro Versuchsbedingung wurde in 10 Reagenzröhrchen, die mit FL-Zellen bewachsen waren, je 1 ml Trypanosomensuspension in TC 199 eingebracht, eingestellt auf eine Protozoenkonzentration von ca. $3 \times 10^6/\text{ml}$. Zugleich wurde soviel ornithosevirushaltige Allantoisflüssigkeit zugegeben, daß eine Viruskonzentration von 1–10 Mäuse-LD₅₀/ml erzielt wurde. Die Kontrollen wurden nach Beimpfung mit Trypanosomen mit gleichviel nichtinfizierter Allantoisflüssigkeit gemischt. Eine weitere Kontrolle bildete das Ansetzen von Gemischen aus Trypanosomen und virushaltiger oder nicht virushaltiger Allantoisflüssigkeit, wobei aber die Reagenzröhrchen keine FL-Zellen enthielten. Die Röhrchen wurden schrägliegend bei 25° C inkubiert und in Abständen von 24 Std. auf ihre Parasitendichte geprüft, indem die Flüssigkeit gut durcheinandergemischt und gleichzeitig unter sterilen Bedingungen 2 Tropfen mit einer Kapillare entnommen wurden. Mit dieser Entnahme wurden Objektträger-Ausstriche angefertigt und zugleich die Trypanosomen in einer Leukozytenzählkammer ausgezählt.

3. 3. 2. *Resultate*: Wie aus Abb. 5 ersichtlich, wird bei einer Ornithosevirkonzentration von ca. 10 MLD₅₀ die Trypano-

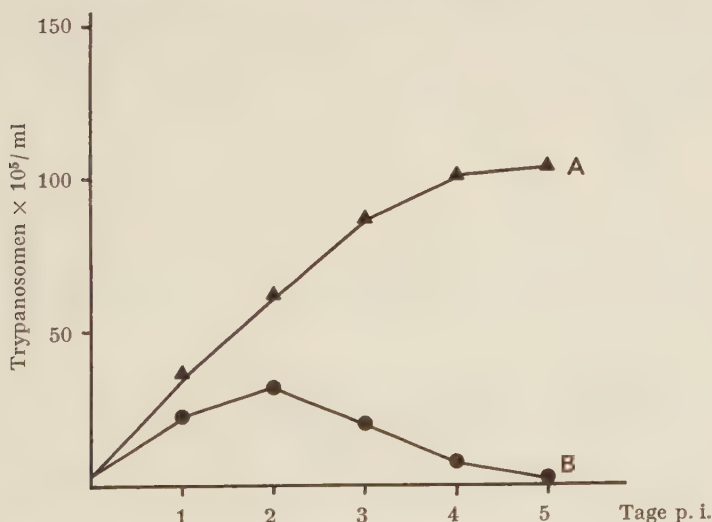


Abb. 5. Vermehrung von *T. brucei* in Ornithosevirus-infizierter und nicht infizierter FL-Zellkultur. A: Kontrolle ohne Virus, B: Versuch mit 10 MLD Ornithosevirus.

somenvermehrung stark gehemmt. Schon 5 Tage nach Beginn des Versuchs sind in den doppelt infizierten Zellkulturen keine Trypanosomen mehr nachweisbar, während die Kontrollen erst nach 10–14 Tagen negativ wurden. Interessant ist, daß die Zunahme der Protozoen am ersten Tag in den Kontroll- und Versuchsröhrchen fast gleich groß ist (die Werte von Versuch und Kontrolle sind nicht signifikant verschieden) und erst vom zweiten Tag an ein schädigender Einfluß des Virus sich bemerkbar macht und auch die Werte von A und B signifikant verschieden werden.

Noch deutlicher wird diese zunächst gleich starke Vermehrung in Abb. 6, welche die Resultate eines Versuchs mit nur ca. einer MLD_{50} von Ornithoseviren wiedergibt: Bis zum dritten Tag p.i. verlaufen die beiden Kurven parallel, und erst vom vierten Tag an zeigen die Werte signifikante Unterschiede.

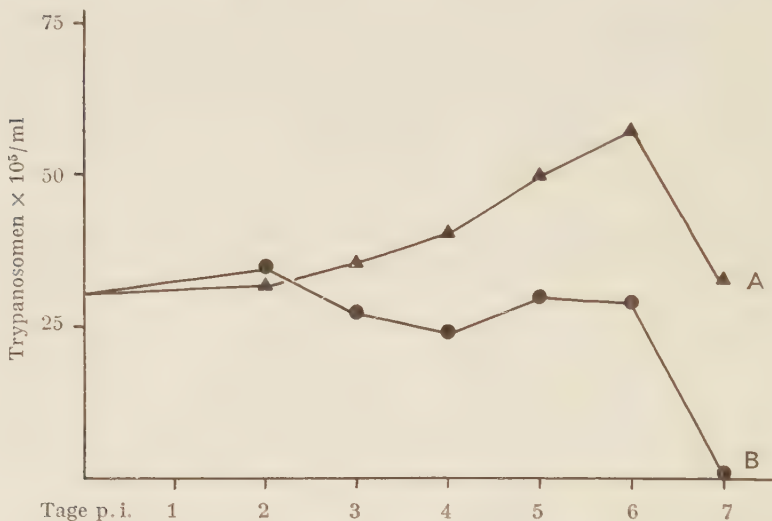


Abb. 6. Vermehrung von *T. brucei* in Ornithosevirus-infizierter und nicht infizierter FL-Zellkultur. A: Kontrolle ohne Virus. B: Versuch mit MLD Ornithosevirus.

Im gleichen Versuch zählte ich die Teilungsformen in Prozent der Gesamttrypanosomen anhand der Giemsa-gefärbten Präparate aus. Abb. 7 gibt die erhaltenen Werte wieder.

Am Ende der Versuche wurde die Viruskonzentration in den Versuchs- und Kontrollröhrchen durch Verimpfen auf Eier und Mäuse zurücktitriert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Röhrchen, die mit Zellen, Viren und Trypanosomen beschickt waren, und denjenigen, die nur Zellen und Viren enthielten, indem

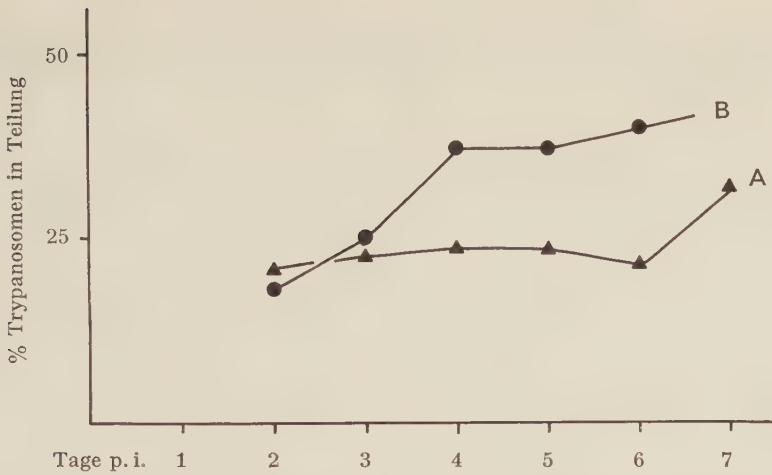


Abb. 7. Häufigkeit der Teilungsformen von *T. brucei* in Ornithosevirus-infizierter und nicht infizierter FL-Zellkultur. A: Kontrolle ohne Virus. B: Versuch mit 1 MLD Ornithosevirus.

nämlich der Virustiter unter beiden Bedingungen jeweils innerhalb von 7 Tagen auf das ungefähr Zehnfache anstieg.

Die pH-Werte in den Versuchs- und Kontrollröhrchen zeigten während der Versuchsdauer von 5 bis 7 Tagen ebenfalls keinen Unterschied. Bei längerer Bebrütung (10–14 Tage) fällt der pH in den Kontrollröhrchen von anfänglich 7,2 auf 6,8 ab.

In den Versuchen, die unter gleichen Bedingungen, aber ohne FL-Zellen durchgeführt wurden, ließ sich kein Effekt von Ornithosevirus auf die Trypanosomen-Kulturformen ablesen (Abbildung 8): Die Trypanosomen vermehren sich im verwendeten

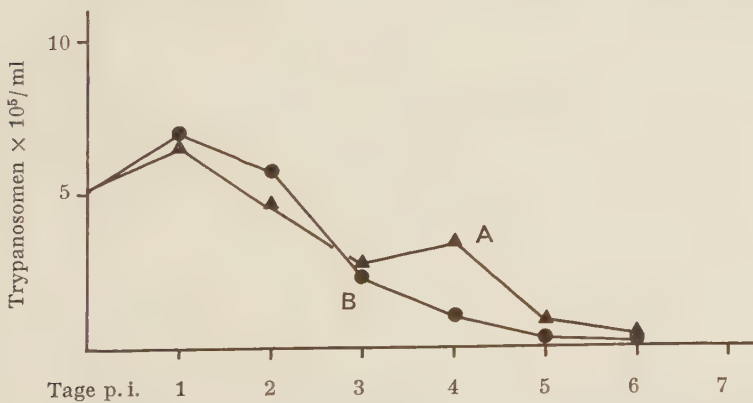


Abb. 8. Vermehrung von *T. brucei* in Kulturen ohne Zellen. A: Kontrolle ohne Virus. B: Versuch mit Ornithosevirus.

Medium ohne Zellen nicht, sondern ihre Zahl nimmt gleichmäßig ab. Auch eine hochdosierte Ornithosevirus-Zugabe ändert diese Kurve nicht.

3. 3. 3. *Interpretation:* Aus den vorgelegten Tatsachen, namentlich aus dem zunächst gleichen Anstieg der Trypanosomen in Zellkulturen bei Versuch und Kontrolle, aus dem zeitlich späteren Abfall der Trypanosomen-Konzentration gegenüber der Kontrolle bei niedrigeren Virus-Dosen (Abb. 6) und aus den signifikant höheren Vermehrungsquoten in den doppelt infizierten Kulturen (Abb. 7) läßt sich schließen, daß ein «toxisches» Prinzip die Trypanosomen langsam schädigt. Dieser Stoff wirkt erst nach einer gewissen Latenzzeit, ist nicht direkt im Viruspräparat enthalten, sondern wird erst im Laufe des Versuchs gebildet. Ob es sich dabei um schädigende Abbaustoffe der Ornithose-infizierten FL-Zellen handelt, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Die Arbeit an diesem Problem geht weiter; obwohl das Fehlen eines Einflusses von Ornithosevirus auf Trypanosomen in Gemischen ohne FL-Zellen eher auf das Auftreten eines toxischen Abbauproduktes aus den Ornithosevirus-infizierten Zellen deuten würde, legen gewisse vorläufige Beobachtungen die Vermutung nahe, daß Ornithoseviren Trypanosomen direkt angreifen und eventuell infizieren können.

3. 4. Einfluß von Ornithosevirus auf 37° C-Kulturformen von *Trypanosoma brucei*

Wie in Abschnitt 3. 2. 4. beschrieben, wandeln sich Trypanosomen aus der Blutform in Kulturformen um, die sich bei 37° C vermehren, wenn sie aus Mäuse- oder Hühnerembryoblut in die Allantoishöhle des Hühnerembryos gespritzt werden.

3. 4. 1. *Versuchsanordnung:* Um den Einfluß von Ornithosevirus auf 37° C-Kulturformen von *T. brucei* zu studieren, wurde trypanosomenhaltiges Hühnerembryoblut mit ornithosevirushaltiger Allantoisflüssigkeit vermischt und in die Allantois von 8- bis 9tägigen Hühnerembryonen inokuliert. Kontrolleier erhielten Trypanosomen und normale, nicht infektiöse Allantoisflüssigkeit (Trypanosomenkontrolle) oder nur Ornithosevirus der gleichen Konzentration wie die Versuchseier (Viruskontrolle). Die Dosierung der Ornithoseviren wurde so niedrig wie möglich gewählt, d. h. so, daß die Embryonen erst nach 7–8 Tagen starben. Täglich wurden von jeder Versuchsgruppe einige Eier ausgewählt, Blut und Allantoisflüssigkeit nach der Technik in Abschnitt 2. 4. entnommen und mikroskopisch auf den Gehalt an Trypanosomen

geprüft. Jedes Ei wurde nur einmal für eine solche Kontrolle verwendet, um Fehler durch eventuell in die Allantoishöhle ausgelaufenes Blut zu vermeiden. Selbstverständlich wurde mit dieser Versuchsanordnung neben dem Einfluß der Ornithoseviren auf die Allantois-Kulturformen zugleich der Einfluß auf die Blutformen im Blutkreislauf des Embryos erfaßt, was aber der Übersichtlichkeit wegen im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

3. 4. 2. *Resultate*: Der schon bei den 25° C-Kulturformen beobachtete Effekt, daß Versuch und Kontrolle am Anfang des Versuchs eine etwa gleich hohe Protozoendichte zeigen, scheint hier noch stärker ausgeprägt zu sein (Abb. 9): Bis zum dritten Tag p.i. ist der Durchschnitt der Protozoenkonzentration in der Allantois sogar leicht höher in den doppelt infizierten Eiern. Die Abnahme an Trypanosomen erfolgt hingegen, vom 4. bis 6. Tag p.i., in den Versuchseiern scheinbar etwas rascher als in den Kontrollen. Die statistische Auswertung der Abb. 9 ergab, daß zu keinem Zeitpunkt die Werte von Versuch und Kontrolle signifikant verschieden sind. Die in der graphischen Darstellung aufgetragenen Mittelwerte aus 10 Eiern pro Kurvenpunkt sind also nur zufällig unterschiedlich. Auch zeigen die Trypanosomen aus den beiden Gruppen, wie in den Versuchen in Zellkulturen, keine morphologischen Unterschiede; auch die Anteile von Mitteldarm- und

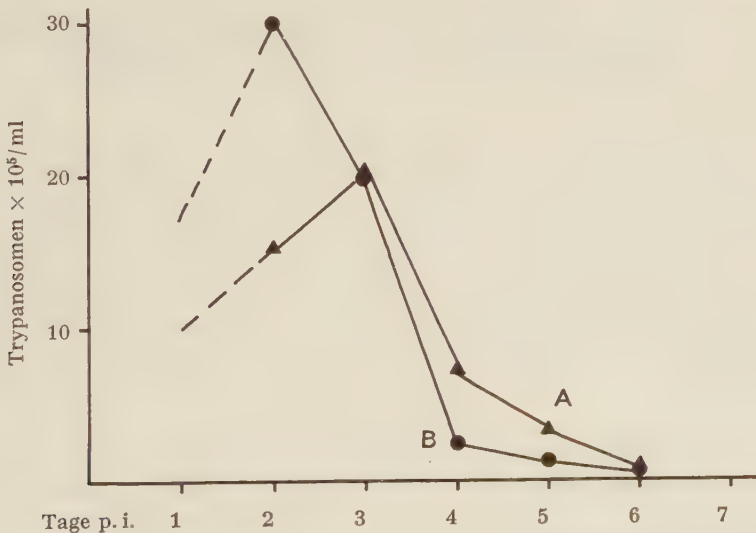


Abb. 9. Vermehrung von *T. brucei* in der Allantoishöhle von Ornithosevirus-infizierten und nicht infizierten Hühnerembryonen. A: Kontrolle ohne Virus. B: Versuch in Ornithosevirus-infizierten Eiern.

Crithidiaformen sind in den Versuchs- und Kontrollembryonen die gleichen.

Die pH-Kurve der Allantoisflüssigkeit (vgl. Abschnitt 3.2.4. Abb. 2) verläuft ebenfalls in Versuchs- und Kontrolleiern gleich.

3.4.3. *Interpretation:* Die Trypanosomenzahlen in der Allantoisflüssigkeit zeigen in Kontroll- und vor allem in den Versuchseiern eine recht breite Streuung. Dies dürfte der Grund für die in Abb. 9 beobachtete scheinbare Abweichung der Werte von A und B sein. Dies sind aber Unterschiede, die, wie ausgeführt, einer statistischen Auswertung nicht standhalten. Es muß deshalb geschlossen werden, daß Ornithosevirus auf 37° C-Kulturformen von *T. brucei* keinen Einfluß zeigt, im Gegensatz zu den in Abschnitt 3.3. geschilderten Versuchen, die eine deutliche Beeinflussung der Trypanosomenvermehrung durch das Virus erkennen lassen.

Daraus läßt sich mit einiger Vorsicht auch schließen, daß die 37° C- und 25° C-Kulturformen, die zwar morphologisch nicht unterschiedlich sind, sich physiologisch doch stark unterscheiden müssen. Dieser Unterschied wird nebenbei auch noch durch die Tatsache verdeutlicht, daß, nach diversen Literaturangaben, eine Zucht von 25° C-Kulturformen weder auf Blutagar noch in Zellkultur bei 37° C möglich ist.

3.5. Einfluß von Ornithose- und Influenzavirus auf Blutformen von *Trypanosoma brucei* im Blutkreislauf des Hühnerembryos

Unsere Versuche in einem Warmblüterwirt ohne spezifische (Antikörper) und unspezifische (z. B. Leukozyten) Abwehrsysteme, nämlich dem Blutkreislauf des Hühnerembryos, haben ihre Bedeutung vor allem im Hinblick auf die Schwierigkeit, solche Beobachtungen in einem immunologisch vollwertigen Wirt, der Labormaus, auszuführen, wo die mögliche direkte gegenseitige Beeinflussung der beiden Mikroorganismen durch Reaktionen des Wirts auf die Parasiten stark verschleiert sein kann (siehe Abschnitt 3.6).

3.5.1. *Versuchsanordnung:* Wie in Abschnitt 3.4.1. dargelegt, wurden die gleichen Eier für die Untersuchung eines Einflusses von Ornithosevirus sowohl auf 37° C-Kulturformen wie auch auf die im Blutkreislauf des Embryos lebenden Blutformen von *T. brucei* verwendet. Es gilt somit die gleiche Versuchsanordnung wie in Abschnitt 3.4. Zu beachten ist allerdings, daß bei dem an-

gewandten Inoculationsmodus erst am 3.–4. Tag p.i. die Parasiten in meßbarer Menge im Blutkreislauf des Embryos erscheinen, was zur Folge hat, daß nur 3–4 Tage lang, d. h. bis zum Tod der Embryonen, die Parasitaemie verfolgt werden kann.

Einige Versuche wurden mit der genau gleichen Anordnung durchgeführt, aber statt Ornithosevirus wurde Influenzavirus vom Stamm A₂-Switzerland 1–57 resp. B-Lee verwendet.

3. 5. 2. *Resultate*: Wie Abb. 10 zeigt, erscheinen die Blutformen der Trypanosomen in den Ornithosevirus-infizierten Eiern in ganz geringer Konzentration zunächst etwas früher im Kreislauf des Embryos als in den Kontrolltieren. Allerdings zeigt schon der nächste Tag, daß sich die Protozoen nicht mehr viel stärker vermehren können und gegen Ende des Versuchs, einen Tag bevor die Eier an Ornithose zugrunde gehen, sogar wieder fast vollständig unterdrückt werden. Die Dichte der Trypanosomen in den Kontrollembryonen hingegen steigt zuerst steil, dann flacher werdend bis zum 7. Tag p.i. an. Entsprechend sind die Werte von A und B nach dem 5. Tag p.i. signifikant verschieden. Einen Tag später sterben in diesen Versuchen die meisten Kontrollembryonen ebenfalls durch den Trypanosomenbefall.

Die Doppelinfektionsversuche mit den beiden Influenzavirustämmen und *T. brucei* hingegen zeigten keine Hemmung der Trypanosomen durch das Virus: die Kurven der Parasitaemie bei doppelt infizierten Eiern und Kontrollen sind, auch statistisch gesehen, identisch.

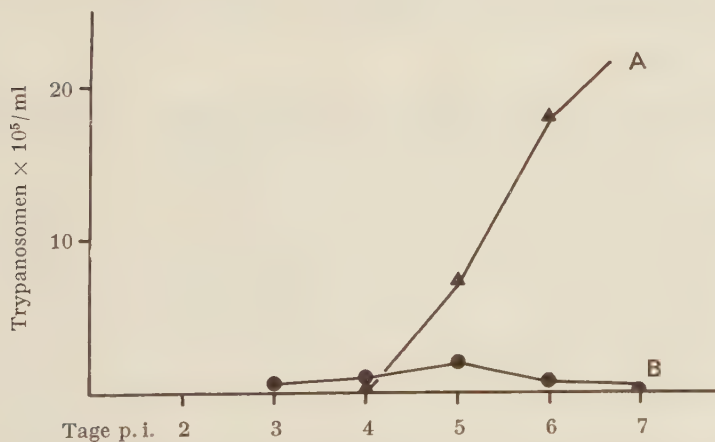


Abb. 10. Vermehrung von *T. brucei* im Blutkreislauf von Ornithosevirus-infizierten und nicht infizierten Hühnerembryonen. A: Kontrolle ohne Virus. B: Versuch in Ornithosevirus-infizierten Eiern.

3. 5. 3. *Interpretation:* Wie eingangs dieses Abschnittes erwähnt, hat diese kräftige Unterdrückung der Trypanosomen durch Ornithosevirus ihre Bedeutung darin, daß sie in einem Wirtssystem erfolgt, das praktisch keine immunologischen Reaktionen auf eine Infektion hervorbringen kann. Deswegen kann der beobachtete Effekt, wie in den Versuchen mit FL-Zellkulturen, einem direkten oder über den gestörten Chemismus der infizierten Hühnerzellen verlaufenden indirekten Einfluß der Ornithoseviren zugeschrieben werden, was in einem immunologisch vollwertigen Wirt, wie der Maus, wegen seiner komplizierten spezifischen und unspezifischen Abwehrreaktion nicht mehr so übersichtlich dargestellt werden kann.

Aus den Versuchen mit Influenzavirus und Trypanosomen läßt sich erkennen, daß ein Einfluß auf Trypanosomen nicht eine generelle Eigenschaft von Viren ist, sondern auf Ornithosevirus und eventuell weitere in dieser Beziehung noch nicht untersuchte Virusarten beschränkt ist. Daß ein Effekt einer Influenza-Infektion auf Trypanosomen praktisch fehlt, ist eigentlich erstaunlich, denn auch eine Infektion mit Influenzavirus führt zum Tode des Embryos. Es ist deshalb anzunehmen, daß auch in Influenza-infizierten Eiern eine Veränderung des Milieus auftritt, und man würde erwarten, daß sich dies im Verlauf der Trypanosomen-Parasitaemie widerspiegelt.

Andrerseits wäre es wohl möglich, daß der beobachtete hemmende Effekt einer Ornithosevirus-Infektion auf das Virus selbst zurückzuführen ist, welches, vielleicht durch Infektion der Protozoen, diese schädigt; dies müßte eine Fähigkeit sein, welche den Influenzaviren abgehen würde (siehe Abschnitt 4. 2.).

3. 6. Einfluß von Ornithose- und Influenzavirus auf Blutformen von *Trypanosoma brucei* im immunologisch vollwertigen Wirt

Die Versuche in Mäusen als Wirtstiere, die in diesem Abschnitt behandelt werden, stellen eigentlich nicht mehr bloße Laborphänomene dar wie die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Experimente, denn solche Mehrfachinfektionen können in der Natur sehr wohl in Säugetieren und Menschen vorkommen. Einzig die Übertragungsweise, sowohl für Viren als auch für Trypanosomen, ist in der Natur eine andere, was allerdings für den Verlauf der Doppelinfektion nicht unwesentlich sein könnte, wie weiter unten noch dargelegt werden soll. Eine Infektion der Mäuse mit dem natürlichen Überträger der Trypanosomen, der Tsetse-Fliege, läßt sich aber wegen der schwierigen Züchtbarkeit

dieses Vektors in der gemäßigten Zone schwerlich im Labor ausführen.

Ebenso ist die immunologische Reaktionslage des Wirtsorganismus von entscheidender Bedeutung für die beobachteten Vorgänge, wie weiter unten noch zu besprechen sein wird. Auch dies ist ein Faktor, der von Tierart zu Tierart und sogar innerhalb einzelner Tierstämme der gleichen Art stark wechseln kann. Gerade die von mir verwendeten C3H-Mäuse scheinen, gemessen an den «Crises typanolytiques», im Vergleich zu den gewöhnlichen weißen Mäusen eine eher schwache Antikörperproduktion aufzuweisen, indem dieses Phänomen der wellenförmigen Parasitaemie etwas später und nicht so deutlich auftritt wie in den weißen Mäusen.

3. 6. 1. Versuchsanordnung:

Viren: Die Ornithoseviren wurden immer 2 Tage vor der Infektion mit Trypanosomen in einer solchen Dosis intraperitoneal gegeben, daß die Mäuse frühestens nach 9 Tagen an der Virusinfektion starben. Somit standen 7 Tage für die Beobachtung der Trypanosomen in der Maus zur Verfügung, gerade die Zeitspanne, die bis zum Einsetzen der «Crises trypanolytiques» verstreicht, ein Phänomen, welches das Ablesen der Versuche wegen seiner Unregelmäßigkeit sowieso fast verunmöglicht.

Einige Versuche wurden an Stelle von Ornithosevirus mit Influenzaviren (A_2 und PR_8) durchgeführt. Auch diese Erreger wurden 2 Tage vor den Trypanosomen gegeben, und zwar in leichter Äthernarkose intranasal. Die Dosierung wurde ebenfalls niedrig gehalten, so daß die Mäuse eine Woche für die Kontrolle der Parasitaemie zur Verfügung standen.

Trypanosomen: Die Protozoen wurden 2 Tage nach den Viren je nach Versuch entweder am gleichen Ort wie diese, also intraperitoneal, injiziert oder aber subcutan am Rücken gegeben, und zwar in Konzentrationen von ca. 10 000 Trypanosomen pro Maus.

Freund'sches Adjuvans: Als Ersatz für eine Virus-Inokulation wurde in einzelnen Versuchen Freund'sches Adjuvans (Compleat, Difco) gegeben, ein Stoff, welcher eine ähnliche, aber sterile Leukozytose im Ascites verursacht wie eine Ornithose-Infektion.

Kontrolle der Parasitaemie: Hierzu wurde ein Tropfen Blut aus dem Schwanz der Maus entnommen und die Protozoendichte im Mikroskop pro Gesichtsfeld, bezogen auf die Anzahl Erythrozyten, ausgezählt. Diese Methode liefert, wie ich in Blindversuchen durch Auszählen in einer Leukozytenzählkammer feststellte, genügend genaue Resultate.

Zählen der Leukozyten: Das Auszählen im Blut erfolgte nach

der üblichen haematologischen Technik mittels Hayem'scher Lösung, ebenso die Auszählung der Leukozyten im Ascites, wobei allerdings zuerst genau 1 ml 3% Natrium-Citrat in die Bauchhöhle injiziert wurde.

3. 6. 2. *Resultate*: Abb. 11 zeigt, wie die Trypanosomen im Blut von Ornithose-infizierten Mäusen in ihrer Entwicklung gehemmt werden. (Die Werte sind schon vom 2. Tag p.i. an signifikant verschieden.) Schon bei der Durchsicht der Nativpräparate fiel mir auf, daß die virusinfizierten Mäuse eine viel höhere Leukozyten-

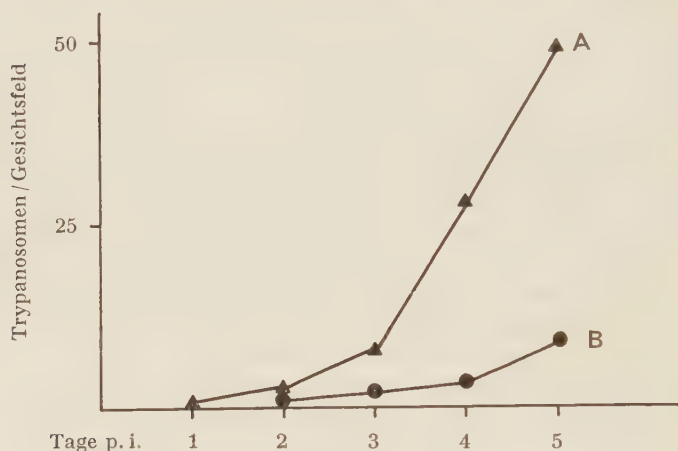


Abb. 11. Vermehrung von *T. brucei* im Blut von Ornithosevirus-infizierten und nicht infizierten C3H-Mäusen. A: Kontrolle ohne Virus. B: Versuch in mit Ornithosevirus infizierten Mäusen.

zahl im Blut aufweisen müssen als die Trypanosomenkontrolle. Daraus ergaben sich die folgenden Versuche, in denen die Leukozytenzahlen im Blut und im Ascites systematisch untersucht wurden und in denen mit Freund'schem Adjuvans eine sterile Entzündung und damit eine Leukozytose im Ascites von Mäusen hervorgerufen wurde. Es zeigte sich allerdings, daß Freund'sches Adjuvans nur zur Vermehrung der Leukozyten im Ascites, nicht aber im Blut führt, wie weiter unten noch zu besprechen sein wird.

Abb. 12 zeigt den Verlauf der Parasitaemie bei einem solchen Versuch, in dem eine Gruppe von Mäusen nur Trypanosomen (A), eine zweite Trypanosomen und Freund'sches Adjuvans (B) und eine dritte Trypanosomen und Viren (C) intraperitoneal erhielt. Die Parasitaemie der Gruppe A verläuft nach dem üblichen Schema, hingegen diejenige der Gruppe B und C ist gleich stark



Abb. 12. Vermehrung von *T. brucei*, intraperitoneal verimpft, in C3H-Mäusen (bis zum Einsetzen der «Crises trypanolytiques»). A: Kontrolle. B: Versuch in Mäusen, die mit Freund'schem Adjuvans behandelt sind. C: Versuch in mit Ornithosevirus infizierten Mäusen.

zurückgedrängt; am 6. Tag liegt die Parasitaemie bei der Gruppe B wieder etwas höher als bei C.

Die Werte der Gruppen B und C sind während des ganzen Versuchs aber nie signifikant voneinander verschieden; hingegen sind sie durchwegs signifikant tiefer als die Werte der Kontrolle A.

Daraus kann zunächst geschlossen werden, daß die Leukozytose im Ascites, sei sie durch Viren oder durch Freund'sches Adjuvans hervorgerufen, wahrscheinlich durch erhöhte Phagozytose die intraperitoneal injizierten Trypanosomen zum Teil vernichtet.

Dies wurde in einem nächsten Versuch bestätigt, in dem mit der sonst gleichen Anordnung (Viren resp. Freund'sches Adjuvans i.p.) die Trypanosomen subcutan am Rücken injiziert wurden, so daß sie nicht mit den Leukozyten des Ascites in Berührung kommen konnten (Abb. 13). Die Beeinträchtigung der Trypanosomen bei der Gruppe C scheint nun wesentlich weniger stark und bei der Gruppe B kaum vorhanden zu sein. Die statistische Analyse ergab, daß zu keinem Zeitpunkt die Werte der drei Gruppen voneinander verschieden sind.

Die folgenden Ausführungen beziehen sich nur auf Versuche, bei denen alle Komponenten intraperitoneal gespritzt wurden. Die Resultate der Leukozyten- und Antikörperuntersuchungen, die am 7. resp. 8. Tag nach der Trypanosomeninfektion gemacht wurden, sind in Abb. 14 zusammengefaßt: Kolonne D und E zeigen die

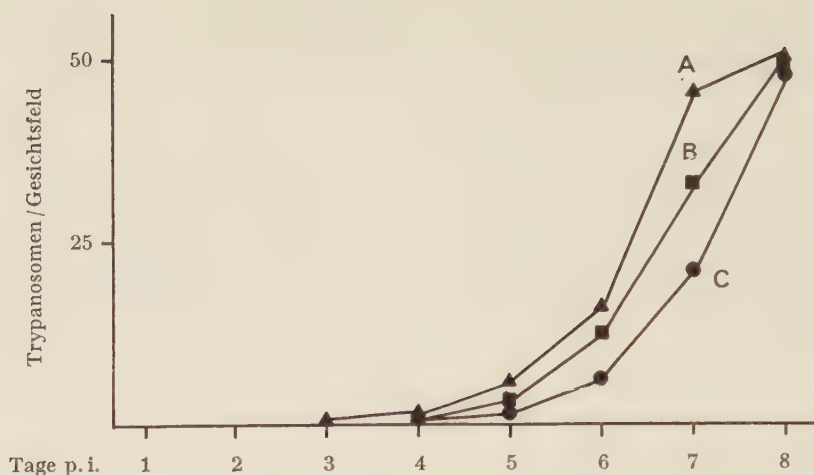


Abb. 13. Vermehrung von *T. brucei*, subcutan verimpft, in C3H-Mäusen. A: Kontrolle. B: Versuch in Mäusen, die mit Freund'schem Adjuvans behandelt sind. C: Versuch in mit Ornithosevirus infizierten Mäusen.

hohen Leukozytenzahlen im Ascites nach Injektion von Ornithoseviren resp. Freund'schem Adjuvans, Kolonne A die kleineren Zahlen nach Injektion von Trypanosomen allein. Bei den Kolonnen C und B hingegen, die die Zahlen bei den mit beiden Agenzien, Trypanosomen und Viren resp. Freund'schem Adjuvans, infizierten Mäusen darstellen, fällt auf, daß ihre Höhe nicht diejenige der Kontrollen D und E erreicht, wie man eigentlich erwarten würde.

Anders liegen die Verhältnisse im Blut: Ornithose macht eine deutliche Leukozytose im Blut (Kol. D), eine gleich hohe Zahl an Leukozyten tritt in den doppelt-infizierten Mäusen auf; Trypanosomen allein, sowie Freund'sches Adjuvans allein und auch beide Agenzien kombiniert, vermögen den Leukozytenspiegel nicht über 2500–3000 Leukozyten pro Kubikmillimeter Blut zu erhöhen, Werte, die für C3H-Mäuse als normal gelten.

Die Titerbestimmung der Antikörper gegen Ornithosevirus (bestimmt in der Haemagglutinationshemmung gegen 4 haemagglutinierende Einheiten) ergibt wiederum ein eigenartiges Resultat: Die Viruskontrollen (D) zeigen einen mehr als doppelt so hohen Antikörpertiter wie die Mäuse der Gruppe C. Die Kolonne A zeigt das Fehlen jeglicher Ornithoseantikörper in der Trypanosomenkontrolle, wie ja zu erwarten ist.

Genau wie bei den Versuchen im Hühnerembryo zeigten auch in der Maus Influenzaviren keinen markanten Einfluß auf die Trypanosomenparasitaemie. Bei einzelnen Mäusen trat wohl kurz-

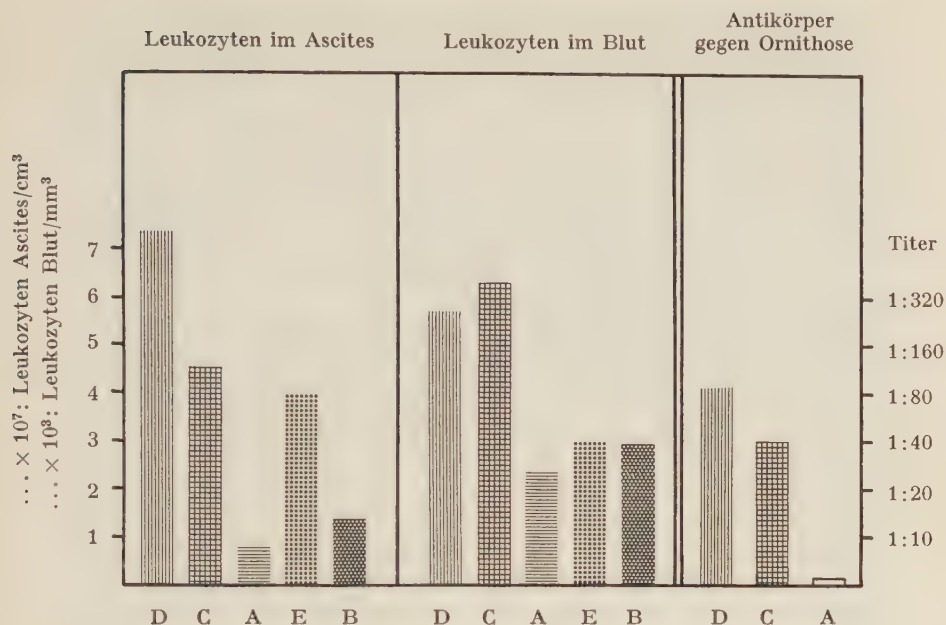


Abb. 14. Leukozytenzahlen und Antikörpertiter. A: Kontrolle: Trypanosomen allein. B: Versuch mit Freund'schem Adjuvans und Trypanosomen. C: Versuch mit Ornithosevirus und Trypanosomen. D: Kontrolle: Ornithosevirus allein. E: Kontrolle: Freund'sches Adjuvans allein. Sämtliche Agenzien wurden intra-peritoneal gegeben.

fristig eine niedrigere Protozoendichte im Vergleich zu den Kontrollen in Erscheinung, bei anderen Tieren aber schien sich die Parasitaemie eher rascher als normal zu entwickeln, so daß also die Streuung der Werte größer wurde, sich statistisch gesehen aber keine Abweichung von der Norm manifestierte.

3. 6. 3. *Interpretation:* Zunächst läßt sich aus diesen Tatsachen herauslesen, daß wir es bei i.p. gespritzten Trypanosomen zum größten Teil mit einer unspezifischen Hemmung durch Ornithoseviren oder Freund'sches Adjuvans zu tun haben, hervorgerufen durch eine Resistenzzunahme der Maus, wobei die Frage offenbleibt, ob es sich dabei um eine erhöhte Phagozytose handelt oder ob ein anderer unbekannter Faktor der Resistenzerhöhung vorliegt (wie dies z. B. BÖHME & DUBOS, 1958, vermuten). Freund'sches Adjuvans bewirkt nur eine Leukozytose im Ascites und keine Leukozytenvermehrung im Blut. Entsprechend werden Trypanosomen, die subcutan am Rücken geimpft werden und nie in den Ascites gelangen und somit auch nicht mit den Leukozyten in Berührung kommen, von diesem Stoff kaum beeinträchtigt. Ornitho-

sevirer hingegen führen nicht nur zu einer Leukozytose im Ascites, sondern auch im Blut. Subcutan geimpfte Trypanosomen werden aber auch in Ornithose-infizierten Mäusen in ihrem Wachstum nicht signifikant beeinträchtigt (Abb. 13), obwohl sie im Blutkreislauf mit einer großen Leukozytenzahl in Berührung kommen. Daraus muß entweder geschlossen werden, daß die Leukozyten des Blutes die Fähigkeit, Trypanosomen zu zerstören, nicht besitzen, oder daß die polymorphen Blutformen der Trypanosomen im Gegensatz zu den Kurzformen des Ascites nicht von Leukozyten angegriffen werden können.

Ein nicht leicht interpretierbares Problem sind aber die Leukozytenzahlen im Ascites, wo die eigenartige Depression in Kolonne C und B (Abb. 14) auffällt. Die zunächst einleuchtendste Erklärung dafür ist, daß die Trypanosomen leukozytosehemmend wirken können, vielleicht dadurch, daß die Leukozyten nach der Phagozytose von Trypanosomen zugrunde gehen oder aber durch eine stoffliche Einwirkung unbekannter Art. Damit wird aber nicht erklärt, warum der durchschnittliche Todestag der Mäuse an Ornithose durch Trypanosomen gar nicht verschoben wird; wenn nämlich die Trypanosomen den lymphatischen Apparat der Mäuse hemmen könnten, müßte ja der Tod durch Ornithose früher eintreten. Und doch ist diese Annahme einer Art von «Immundepression» durch Trypanosomen nicht ganz von der Hand zu weisen, denn die doppelinfizierten Mäuse weisen ja auch signifikant weniger Ornithose-Antikörper auf als die Viruskontrollen.

Wenn wir die Resultate der Versuche im Blut des Hühnerembryos heranziehen (Abschnitt 3. 5.), erhebt sich die Frage, ob auch im immunologisch vollwertigen Wirt, der Maus, ein mehr oder weniger direkter Einfluß der Ornithoseviren auf die Trypanosomenvermehrung stattfindet. Wie oben diskutiert, wird ein solcher direkter Einfluß überdeckt durch hauptsächlich unspezifische Abwehrmechanismen, die dem Hühnerembryo abgehen. Diese Frage muß vorläufig offenbleiben, um so mehr als ja mit Freund'schem Adjuvans eine Ornithoseinfektion nicht in allen Teilen simuliert werden kann, was übrigens schon daraus hervorgeht, daß Freund'sches Adjuvans nicht zu einer eigentlichen Krankheit führt, Ornithose die Mäuse aber unweigerlich tötet.

4. Diskussion

4. 1. Züchtung von *Trypanosoma brucei*

Die Zucht von Trypanosomen in Zellkultur (als Kulturformen) und in der Labormaus (als Blutformen) bietet keinerlei Schwierigkeiten.

rigkeiten und ist auch von anderen Autoren zur Genüge erforscht und beschrieben worden. Hingegen sind die Angaben über die Zucht dieser Protozoen im Hühnerembryo recht spärlich. Besonders über die Vermehrung und Umwandlung der Trypanosomen in der Allantoishöhle habe ich keinerlei Angaben in der Literatur gefunden, und ich möchte deshalb annehmen, daß den Forschern, die sich bis jetzt mit diesem Problembereich befaßt haben, diese Verhältnisse entgangen sind. Die Umwandlung von Blutformen in Kulturformen und deren Vermehrung in der Allantoishöhle bei 37° C ist deshalb bemerkenswert, weil mit anderen Systemen, wie Blutagar und Zellkultur, keine Zucht von Kulturformen bei dieser Temperatur möglich ist. Auch scheint mir klar zu sein, daß für eine Umwandlung von Blut- in Kulturformen die Temperatur, im Gegensatz zur oft zitierten Meinung, keine Rolle spielt. Auch das Vorhandensein oder Fehlen von Blut hat keinen Einfluß auf diese Umwandlung; hingegen ist eine Vermehrung der bereits zu Kulturformen gewordenen Protozoen nur möglich, wenn mindestens 2% Blut im Medium vorliegen (vgl. Abschnitt 3. 2. 4.).

Der bestimmende Einfluß für die beschriebene Umwandlung von Blut- in Kulturformen dürfte viel eher beim Sauerstoffangebot zu suchen sein. Auch die elektronenoptischen Untersuchungen von VICKERMAN (1962) deuten in diese Richtung. Dieser Autor konnte zeigen, daß die Mitochondrien bei Kulturformen viel größer und besser entwickelt sind als bei Blutformen, was er als Ausdruck von milieubedingt veränderten oxydativen Prozessen deutet. Allerdings wurden diese Befunde an 25° C-Kulturformen erhoben, und es wäre interessant, in dieser Beziehung auch die 37° C-Kulturformen der Allantoishöhle zu untersuchen. Entsprechende Arbeiten sind im Gang.

Die Bedeutung des Hühnerembryos als lebendes Medium zur Zucht von Kultur- und Blutformen von *T. brucei* liegt meines Erachtens in der Möglichkeit, die Umwandlung von Blut- in Kulturformen und das Penetrationsvermögen von Blutformen (welche nach Allantoisimpfung ja in den Blutkreislauf eindringen) in einem immunologisch vollständig inaktiven System studieren zu können. Auch die relative Unempfindlichkeit von Hühnerembryonen gegenüber verschiedenen Antibiotica und Medikamenten könnten für pharmakologische Untersuchungen von Nutzen sein; wobei aber, was die Kulturformen betrifft, ihre unregelmäßige Vermehrung und die große Streuung der Parasitendichte ein schwerwiegender Nachteil ist, wie schon bei meinen Versuchen der Doppelinfektionen in Abschnitt 3. 4. 3. erwähnt.

4. 2. Doppelinfektionen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, wie eingangs erwähnt, die Verhältnisse bei Mehrfachinfektionen abzuklären. Das dazu verwendete System Ornithosevirus—*T. brucei* gehört zur ersten der beiden in der Einleitung erwähnten Möglichkeiten von Doppelinfektionen, indem Trypanosomen in 3 von 4 geprüften Wirtssystemen durch Ornithoseviren in ihrer Vermehrung gehemmt werden.

Während es sich bei den Resultaten der Versuche in den 3 Systemen Zellkultur, Allantoishöhle und Blutkreislauf des Hühnerembryos eigentlich um reine Laborphänomene handelt, die nützlich sein können, um den eigentlichen Wirkungsmechanismus der Hemmung abzuklären, so spiegeln die Resultate in der Labormaus eher Verhältnisse wider, wie sie bei natürlichen Infektionen auftreten könnten. Noch einmal sei aber darauf hingewiesen, daß diese Resultate der Versuche in den Mäusen nur für diesen Mäusestamm gelten, da Resistenz- und Abwehrmechanismen gegenüber Infektionen bei anderen Tierstämmen ganz anders geartet sein können. Die beschriebenen Versuche haben also hauptsächlich den Sinn, an einem Modellfall zu zeigen, mit welchen komplexen Reaktionen auf Doppelinfektionen in einem Säugervirt gerechnet werden muß; bei dieser Sachlage wird das Auffinden eines eventuellen direkten Einflusses der beiden Mikroorganismen aufeinander sehr stark erschwert.

Für die Abklärung einer mehr oder weniger direkten wechselseitigen oder einseitigen Störung der Parasiten wird man sich daher vor allem auf die übersichtlicheren Verhältnisse im Hühnerembryo und eventuell der Zellkultur beschränken müssen; die Schwierigkeit der Interpretation beruht dann vor allem in der Möglichkeit, daß diese anders gearteten Wirtssysteme unter Umständen die Physiologie der Trypanosomen derart verändern, daß z. B. Blutformen aus dem Hühnerembryo und der Maus nicht direkt verglichen werden dürfen.

Wie bei den Interpretationen zu den beschriebenen Versuchen erwähnt, scheinen mir im Moment zwei Möglichkeiten der Einwirkung von Ornithosevirus auf Trypanosomen denkbar zu sein:

- a) Ornithosevirus-infizierte Zellen produzieren wegen ihres gestörten Stoffwechsels (siehe z. B. CROCKER et al., 1965) ein «Toxin», das die Trypanosomen schädigt. Wir hätten es somit mit einem «indirekten Angriff» zu tun.
- b) Der Angriff der Ornithoseviren auf die Trypanosomen erfolgt direkt, d. h. durch eine Infektion des Trypanosoms. Eine

solche Infektion müßte aber fast sicher abortiv verlaufen, denn nie wurden typische Vermehrungsstadien von Ornithoseviren in den Protozoen gefunden; es ist allerdings zu bemerken, daß die Volutinkörnchen der Trypanosomen den reifen Elementarpartikeln von Ornithoseviren in der Giemsa-Färbung auffallend gleichen.

Mit dieser zweiten Möglichkeit stimmen einige vorläufige Beobachtungen in Zellkulturen überein, und darüber hinaus könnten (mit allem Vorbehalt) die negativen Resultate, die mit Influenzaviren erhalten wurden, erklärt werden: Influenzaviren sind viel schwieriger züchtbar als Ornithoseviren und können, im Gegensatz zu den letzteren, nur wenige Zellsorten infizieren und sich darin vermehren. Es wäre somit denkbar, daß auch Trypanosomen zu den für Influenzaviren ungeeigneten Zelltypen gehören und deswegen von diesen Viren nicht angegriffen werden, wogegen die wegen ihres höher entwickelten Metabolismus «anspruchloseren» Ornithoseviren auch Trypanosomen als Wirtszellen akzeptieren können.

4. 3. «Immundepression»

Der letzte Punkt der Diskussion betrifft die «Immundepression» in den trypanosomeninfizierten Mäusen, wie in Abb. 14 dargestellt. Dieser Problemkreis ist noch vollständig unklar, obwohl das Phänomen in meinen Versuchen durchaus signifikant und reproduzierbar ist. Hier bietet sich eigentlich nur eine Erklärungsmöglichkeit an, besonders wenn man die, wie oben erwähnt, schwache Ausprägung der «Crises trypanolytiques» in den C3H-Mäusen in Betracht zieht: Die Trypanosomen haben oder entwickeln in den C3H-Mäusen die Fähigkeit, die immunologische Antwort ihres Wirtes zu schwächen. Diese Fähigkeit beschränkt sich offenbar speziell auf C3H-Mäuse, weil in anderen Mäusestämmen die «Crises trypanolytiques» viel ausgeprägter verlaufen. Auch für die Untersuchung dieser Vermutung sind experimentelle Arbeiten geplant.

Literaturverzeichnis

- BARNETT, S. F. (1963). *Eperythrozoon parvum* in pigs in Kenya. — Bull. epizoot. Dis. Afr. 11, 185-195
- BEDSON, S. P. & BLAND, J. O. W. (1932). A morphological study of Psittacosis virus, with the description of a developmental cycle. — Brit. J. exp. Path. 13, 461-466
- BEDSON, S. P. (1933). Observations on the developmental forms of Psittacosis virus. — Brit. J. exp. Path. 14, 267-277

- BEDSON, S. P. & BLAND, J. O. W. (1934). The developmental forms of Psittacosis virus. — Brit. J. exp. Path. 15, 243-247
- BEDSON, S. P. & GOSTLING, J. V. T. (1954). A study of the mode of multiplication of Psittacosis virus. — Brit. J. exp. Path. 35, 299-308
- BEVERIDGE, W. I. B. & BURNET, F. M. (1946). The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo. — Spec. Rep. Ser. med. Res. Coun. (Lond.) 256
- BLAND, J. O. W. & CANTI, R. G. (1935). The growth and development of Psittacosis virus in tissue culture. — J. Path. Bact. 40, 231-241
- BÖHME, D. & DUBOS, R. J. (1958). The effects of bacterial constituents on the resistance of mice to heterologous infection. — J. exp. Med. 107, 523-536
- BUCKLEY, S. M., WHITNEY, E. & RAPP, F. (1955). Identification by fluorescent antibodies of developmental forms of Psittacosis virus in tissue culture. — Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 90, 226-230
- BURNET, F. M. & ROUNTREE, P. M. (1935). Psittacosis in the developing egg. — J. Path. Bact. 40, 471-481
- CORBET, P. S., WILLIAMS, M. C. & GILLETT, J. D. (1961). O'nyong-nyong-fever: an epidemic virus disease in East Africa. IV. Vector studies at epidemic sites. — Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 55, 463-480
- CROCKER, T., PELC, S. R., NIELSEN, B. I., EASTWOOD, J. M. & BANKS, J. (1965). Population dynamics and DNA-synthesis in HeLa cells infected with an Ornithosis agent. — J. infect. Dis. 115, 105-122
- DEMARCHI, J. & NICOLI, J. (1960). La multiplication des agents des trypanosomiasés humaines africaines en culture de tissus. — Ann. Inst. Pasteur 99, 120-130
- DODIN, A. & FROMENTIN, H. (1962). Premier essai de culture de trypanosomes en milieu synthétique. — Bull. Soc. Path. exot. 55, 797-804
- FAGARD, P., CHARDOME, M. & PEEL, E. (1962). Transmission d'un trypanosome du groupe brucei aux embryons de poulet par inoculation sur la membrane chorion-allantoïdienne. Naissance d'un poussin infecté d'un trypanosome du groupe brucei. — Ann. Soc. belge Méd. trop. 42, 697-702
- FOOTE, L. E., LEVY, H. E., TORBERT, B. J. & OGLESBY, W. T. (1957). Interference between Anaplasmosis and Eperythrozoonosis in splenectomized cattle. — Amer. J. vet. Res. 18, 556-559
- GEIGY, R. & AESCHLIMANN, A. (1957). Ratten als Reservoir von *Borrelia duttoni*. — Z. Tropenmed. Parasit. 8, 96-106
- GIRARDI, A. J., ALLEN, E. G. & SIGEL, M. M. (1952). Studies on the Psittacosis-Lymphogranuloma-group. II. A non infectious phase in virus development following absorption to host tissue. — J. exp. Med. 96, 233-246
- GLEDHILL, A. W. (1956). Quantitative aspects of the enhancing action of Eperythrozoon on the pathogenicity of mouse hepatitis virus. — J. gen. Microbiol. 15, 292-303
- GLEDHILL, A. W. & NIVEN, J. S. F. (1957). The toxicity of some bacterial filtrates for mice preinfected with *Eperythrozoon coccoides*. — Brit. J. exp. Path. 38, 284-290
- GOLUP, O. J. (1948). A single dilution method for the estimation of DL₅₀-titers of the Psittacosis-LGV-group of viruses in chick embryos. — J. Immunol. 59, 71-82
- HALLAUER, C. & KUHN, H. (1940). Über die Dauerzüchtung von Naganatrypanosomen und Rückfallfieberspirochaeten im befruchteten Hühnerei. — Z. Hyg. Infekt-Kr. 122, 406-411
- HILLEMANN, M. R., HAIG, D. A. & HELMOLD, R. J. (1951). The indirect complement fixation, haemagglutination and conglutinating complement ab-

- sorption tests for Viruses of the Psittacosis-Lymphogranuloma-venereum group. — J. Immunol. 66, 115-130
- HSU, D. Y. M. & GEIMANN, Q. M. (1952). Synergistic effect of *Haemobartonella muris* on *Plasmodium berghei* in white rats. — Amer. J. trop. Med. Hyg. 1, 747-760
- JACOBS, H. R. (1957). Effect of Ornithosis on experimental fowl malaria. — Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 95, 372-373
- LAPIÈRE, J., GAILLARD, H. & ROUSSET, J.-J. (1964). Etude de l'action protectrice des *Borrelia* dans les infections expérimentales à trypanosomes chez la souris. — C. R. Soc. Biol. (Paris) 158, 1047-1050
- LITWIN, J. (1957). A simple method for cultivation of viruses and rickettsiae in the chorio-allantoic ectoderm of the chick embryo by inoculation via the air sac. — J. infect. Dis. 101, 100-108
- LITWIN, J. (1959). The growth cycle of the Psittacosis group of microorganisms. — J. infect. Dis. 105, 129-160
- LITWIN, J., OFFICER, J. E., BROWN, A. & MOULDER, J. W. (1961). A comparative study of the growth cycles of different members of the Psittacosis group in different host cells. — J. infect. Dis. 109, 251-279
- LONGLEY, B. J., CLAUSEN, N. M. & TATUM, A. L. (1939). Cultivation of various species of *Trypanosoma* in the developing chick embryo. — Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 41, 365-366
- MANIRE, G. P. & MEYER, K. F. (1950). The toxins of the Psittacosis-LGV-group of agents. I. Toxicity of various members of the Psittacosis-LGV-group. — J. infect. Dis. 86, 226-232
- MOULDER, J. W. (1964). The Psittacosis-group as bacteria. — New York: John Wiley = Ciba-Foundation
- NICOLI, J. (1961). Etude préliminaire sur les conditions de culture de *Trypanosoma gambiense*. — Bull. Soc. Path. exot. 54, 77-83
- PETERS, W. (1965). Competitive relationship between *Eperythrozoon coccoides* and *Plasmodium berghei* in the mouse. — Exp. Parasit. 16, 158-166
- PFANZAGL, J. (1966). Allgemeine Methodenlehre der Statistik. — Berlin: Walter de Gruyter und Co.
- RAKE, G. & JONES, H. P. (1944). Studies on Lymphogranuloma venereum. II. The association of specific toxins with agents of the LGV-Psittacosis-group. — J. exp. Med. 79, 463-486
- REED, L. J. & MUENCH, H. (1938). A simple method of estimating 50 per cent endpoints. — Amer. J. Hyg. 27, 493-497
- SWAIN, R. H. A. (1955). A microscopical study of the reproduction of Psittacosis virus. — Brit. J. exp. Path. 36, 507-514
- TAIJMA, M., NOMURA, Y. & KUBOTA, Y. (1957). Structure and development of viruses of the Psittacosis-Lymphogranuloma-group observed in the electron microscope. — J. Bact. 74, 605-620
- TRAGER, W. (1959). A new virus of ducks interfering with the development of malaria parasite (*Plasmodium lophurae*). — Proc. Soc. exp. Med. (N.Y.) 101, 578-582
- VICKERMAN, K. (1962). The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: An hypothesis based on ultra-structural observations. — Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 56, 487-495
- YANAMURA, H. Y. & MEYER, K. F. (1941). Studies on the virus of Psittacosis cultivated *in vitro*. — J. infect. Dis. 68, 1-15
- YOELI, M., BECKER, Y. & BERNKOPF, H. (1955). The effect of West-Nile-virus on experimental malaria infection (*Plasmodium berghei*) in mice. — Harefuah 49, 116-119

Résumé

Le travail présent a été entrepris afin d'étudier quelques aspects de l'interaction entre deux microorganismes dans le même hôte. Les deux parasites choisis, c'est-à-dire une souche de virus d'ornithose d'une part, et la souche Lab. 110 de *Trypanosoma brucei* d'autre part, ont d'abord été étudiés séparément dans différents hôtes :

Une souche d'un virus d'ornithose fraîchement isolée est décrite. Sa biologie et sa morphologie permettent sans difficulté de la classer dans le groupe des Miyagawanellas.

Trypanosoma brucei se cultive :

1° dans la souris comme forme sanguine polymorphe ;

2° dans des cultures de cellules FL à 25° C comme formes de culture, qui sont identiques à celles qu'on trouve dans les cultures sur gélose enrichie de sang ;

3° dans l'embryon de poulet, mais sous deux formes entièrement différentes :

a) comme forme de culture dans la cavité allantoïdique (appelée forme de culture à 37° C). Ces formes ressemblent également à celles qu'on trouve dans les cultures sur gélose à 25° C.

Ces formes de culture à 37° C ne se laissent cultiver que pendant deux passages consécutifs dans la cavité allantoïdique. Elles ont besoin pour leur croissance dans ce milieu d'au moins 2 % de sang soit humain, soit de souris, soit d'embryon de poulet. Ce sang doit être injecté en même temps dans l'embryon que les parasites. Les protozoaires disparaissent autour du 16^e jour à cause d'une diminution rapide du pH ;

b) comme forme sanguine dans le système circulatoire de l'embryon.

Les résultats suivants concernent l'interaction des deux parasites dans différents hôtes :

— Le virus d'ornithose empêche la croissance des formes de culture de trypanosomes cultivées à 25° C en culture de cellules FL.

— Aucune influence du même virus sur les formes de culture à 37° C cultivées dans la cavité allantoïdique de l'œuf embryonné n'a été démontrée.

— Par contre, les formes sanguines de trypanosomes sont presque complètement inhibées dans le système circulatoire de l'embryon de poulet infecté avec le virus d'ornithose.

— Un effet spécifique du virus d'ornithose sur les trypanosomes injectés dans des souris de la souche C3H-eB/Gif est difficile à démontrer, parce qu'une infection virale augmente la résistance anti-infectieuse non-spécifique de l'hôte. On obtient un même effet protecteur contre les trypanosomes avec une injection d'adjuvant de Freund, ce qui provoque également une résistance anti-infectieuse.

— Le virus d'influenza (souches A et A₂) ne montre pas d'effet sur les trypanosomes ni dans l'embryon de poulet ni dans la souris.

— L'étude des nombres de leucocytes et des titres d'anticorps dans la souris infectée avec des virus et des trypanosomes indique la possibilité d'une influence des trypanosomes sur l'appareil immunologique de l'hôte.

— La signification de la culture des trypanosomes dans l'œuf embryonné et des mécanismes possibles de l'influence des virus d'ornithose sur les trypanosomes sont discutés.

Summary

The present investigation was undertaken in order to study some aspects of the interactions between two microorganisms in the same host. At first, the two parasites, a strain of ornithosis virus on one hand and *Trypanosoma brucei*, strain Lab. 110, on the other hand, are examined separately in different hosts:

A freshly isolated strain of a virus of the psittacosis-ornithosis group is studied. Its morphological and biological characteristics indicate that it belongs to the commonly accepted Miyagawanella-group.

Trypanosoma brucei is cultivated:

- (1) in mice where the typical polymorphic blood forms are found;
- (2) in FL-cell-cultures at 25°C, where culture forms develop similar to those found in blood-agar-cultures;
- (3) in the chick embryo where two distinct morphologic forms are found:
 - a) culture forms in the allantoic cavity (called 37°C culture forms), similar to those in blood-agar-cultures.

These 37°C culture forms can be cultivated for not more than two subsequent passages in the allantoic cavity and they need for their multiplication in this medium at least 2% of mouse-, human- or chick embryo blood, which must be injected together with the parasites. They disappear at the 16th day of embryonic development due to a sudden drop in pH of the allantoic fluid;

- b) polymorphic blood forms in the blood stream of the embryo.

The following results concern the interaction between viruses and trypanosomes in different hosts:

— The growth of culture forms of *T. brucei*, cultivated at 25°C on FL-cells, is inhibited by ornithosis viruses.

— No influence of the same virus upon 37°C culture forms of *T. brucei* could be detected.

— Blood forms of trypanosomes are suppressed in chick embryos super-infected with the virus of ornithosis.

— It seems very difficult to find a direct influence of ornithosis virus upon trypanosomes in the laboratory mouse (strain C3H-eB/Gif) because this virus stimulates non-specific mechanisms of resistance. Freund's adjuvant suppresses trypanosomes to about the same degree as a virus infection does, which is also due to activation of non-specific resistance.

— Influenza viruses (strains A and A₂) show neither in the chick embryo nor in the mouse any effect upon trypanosomes.

— Leucocyte counts and antibody titres from mice infected with both viruses and trypanosomes, suggest a possible influence of trypanosomes upon the immunological apparatus of mice.

— Some aspects concerning the cultivation of trypanosomes in the chick embryo and possible mechanisms of the interaction between ornithosis virus and trypanosomes are discussed.

Curriculum vitae

Am 12. September 1940 wurde ich, KURT BIENZ, als Sohn des Alfred Bienz, Bankangestellter, und der Clara Bienz geb. Weiss in Basel geboren. Mein Heimatort ist Basel. Hier besuchte ich die Primarschule und trat im Jahre 1951 ins hiesige Realgymnasium ein, wo ich im Frühjahr 1960 die Maturität Typus B bestand. Im Sommersemester 1960 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel, wo ich als Hauptfach Zoologie und als Nebenfächer Chemie, Bakteriologie und Botanik studierte. Ich besuchte die Vorlesungen und Praktika folgender Herren Professoren und Privatdozenten: M. Brenner, H. Dahn, H. Erlenmeyer, T. Freyvogel, M. Geiger-Huber, R. Geigy, C. Grob, P. Huber, H. Löffler, H. Nüesch, A. Portmann, M. Reiff, P. Schmid, W. Stingelin, J. Tomcsik, H. Zoller. Seit November 1963 war ich mit der Ausarbeitung meiner Dissertation unter der Leitung der Herren Professoren R. Geigy und H. Löffler beschäftigt.

